



DETECCIÓN DE VARIABILIDAD MACROSCÓPICA DE *Fusarium proliferatum* MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN

Gálvez Patón, Laura¹

Tutores: Elorza Barreiro, Pilar²; Palmero Llamas, Daniel¹

¹Departamento de Producción Agraria. E.T.S.I.A.A.B. Universidad Politécnica de Madrid

²Departamento de Ingeniería Agroforestal. E.T.S.I.A.A.B. Universidad Politécnica de Madrid
laura.galvez@upm.es

RESUMEN

Fusarium proliferatum es un hongo fitopatógeno relevante por su capacidad de producir micotoxinas y del que existe poca información acerca de su variabilidad intraespecífica. Las características macroscópicas de sus colonias pueden ser utilizadas para caracterizar dicha variabilidad de una forma rápida y rutinaria. En este trabajo, se propone una metodología para poner a punto una técnica que permita diferenciar aislados de *F. proliferatum* en base a sus características morfológicas y cromáticas mediante el uso de técnicas de análisis de imagen. Se ha realizado la siembra de 27 aislados de *F. proliferatum* sobre placas Petri con medio de cultivo, incubadas a 25°C, donde se realizaban capturas de imagen periódicas. Las imágenes fueron analizadas con el programa MATLAB con el uso de rutinas típicas y propias. Los resultados muestran que el análisis de imagen es una técnica idónea para la obtención de las tasa de crecimiento micelial y parámetros cromáticos de una forma automática y rutinaria, lo que permite caracterizar los distintos aislados de *F. proliferatum* en base a estos parámetros.

Palabras clave: análisis de imagen, crecimiento micelial, variabilidad

INTRODUCCION

Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg es un hongo polífago, patógeno que puede afectar a cultivos de diversas plantas de interés agroalimentario. Además de por su patogenicidad, este hongo destaca por su capacidad para producir micotoxinas que pueden acumularse en los productos cosechados convirtiéndose en una potencial fuente de riesgo para la salud humana debido a su carácter carcinógeno (Desjardins, 2006).

El estudio del grado de variabilidad es muy importante, puesto que influye de manera muy importante en la respuesta que tendrá una especie frente a tratamientos de control. Aunque existe poca información disponible sobre la variabilidad intraespecífica de *F. proliferatum* a nivel fenotípico, metabólico y genético, algunos estudios subrayan la gran variabilidad intraespecífica de esta especie atendiendo a los análisis filogenéticos; a su potencial como productor de micotoxinas o a su tasa de crecimiento (Jurado et al., 2010; Stępień et al., 2011; Palacios et al., 2015). Sin embargo, no existen estudios sobre la variabilidad en las características morfológicas macroscópicas de sus colonias, debido en parte a la gran dificultad de caracterizar dichos ensayos experimentales.

La morfología de las colonias de *F. proliferatum* es muy variable y pueden presentar dos fenotipos: uno de tipo micelial con abundante micelio aéreo de blanco a púrpura-violeta algodonoso y otro de tipo pionnotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo con apariencia húmeda y amarillenta (Leslie y Summerell, 2006). Generalmente, los aislados producen pigmentos violetas en el medio agarizado, pero en general esta pigmentación puede variar en intensidad desde incoloro a casi negro-violeta; en algunas cepas, además, se pueden desarrollar esclerocios negro-azulados.

Algunas de las características macroscópicas de las colonias se registran habitualmente de una forma manual. La tasa de crecimiento se obtiene mediante la medición manual de los diámetros de las colonias con ayuda de una regla o de escalímetros digitales. El análisis de imagen podría ser una técnica idónea como alternativa a la medición manual de las colonias fúngicas para la obtención de las tasas de crecimiento micelial de una



forma más fiable y ajustada. Además, el análisis automatizado de las imágenes permite el uso de las fotografías para la extracción de diferentes parámetros cromáticos que permitirían caracterizar los aislados fúngicos de una forma automática y rutinaria. En este trabajo, se propone una metodología para poner a punto una técnica que permita obtener las tasas de crecimiento micelial, así como parámetros cromáticos de diferentes aislados de *F. proliferatum* mediante el uso de técnicas de análisis de imagen.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el desarrollo de este ensayo experimental se han utilizado 27 aislados de *F. proliferatum* procedentes de dientes de ajo con síntomas de podredumbre de diferentes zonas ajeras de España. La siembra de los aislados se realizó sobre placas Petri de 60 mm diámetro con medio de cultivo PDA (Patata Dextrosa Agar, Conda). Se inocularon de tres a cuatro placas por cada aislado, con 2 μ L de una suspensión de conidios a 10^5 conidios/mL en el centro de las placas, las placas fueron selladas con parafilm e incubadas a 25 °C en oscuridad durante 15 días.

Las capturas de las fotografías digitales se realizaron con iluminación natural difusa, con dos modos de exposición diferentes: modo M (manual), donde se elige completamente el ajuste de la exposición, tanto la apertura de diafragma como la velocidad de obturación y modo Av (semiautomático), que permite seleccionar la apertura del diafragma y la cámara establece automática la velocidad de obturación. La captura de las imágenes de las colonias se realizaba junto a una escala de distancias para su posterior calibrado. La captura de las fotografías digitales se realizaron con una cámara fotográfica de tipo reflex Canon EOS 1200D, con objetivo de 50 mm y distancia mínima de enfoque de 50 cm. Las fotografías fueron analizadas mediante el programa informático Matlab R2015b (Mathworks Inc) empleando rutinas específicamente desarrolladas para cada tarea a partir de la librería de análisis de imagen (Image Processing Toolbox™). Para el cálculo de la tasa de crecimiento micelial de forma manual, se midieron dos diámetros perpendiculares de las colonias con un escalímetro digital y se calculó la media; con el método de análisis de imagen las colonias fueron fotografiadas a los 3 y 4 días y se realizaron las siguientes tareas: 1) segmentación automática de la imagen empleando el método de Otsu (maximiza la varianza entre grupos y minimiza la varianza dentro de los grupos); 2) selección manual del área de interés en la imagen en el canal rojo, 3) identificación del objeto en el área de interés y extracción de diferentes propiedades geométricas entre los que destacan el eje mayor, eje menor y diámetro equivalente (valores típicos del análisis de imagen con Matlab), 4) calibración de las medidas mediante la conversión de píxeles a milímetros. En este método se han obtenido las medias entre el eje mayor y menor de la colonia. Para la toma de los parámetros cromáticos, se realizaron la captura de las imágenes a los 7 y 15 días y se registraron los perfiles cromáticos radiales a partir del modelo de color RGB al seleccionar el centro de la colonia en diferentes radios (de 10 hasta 500 píxeles en saltos de 5 píxeles) empleando coordenadas polares (desarrollo propio). De forma automática, se obtuvieron los valores “R” (rojo), “G” (verde) y “B” (azul) para cada radio en un archivo excel.

En el análisis estadístico de datos de la tasa de crecimiento micelial, en primer lugar se realizó una regresión logística binaria que permitió determinar el grado de influencia de las variables “día de incubación del hongo” (tres y cuatro días) y “modo de exposición de la cámara fotográfica” (modo M y modo Av), sobre la frecuencia del reconocimiento correcto de la colonia en la imagen. La variable dependiente es dicotómica: la respuesta 1 es la probabilidad de que la colonia haya sido detectada adecuadamente (respecto al contraste visual) y la respuesta 0 es la probabilidad de que no se detecte adecuadamente la colonia. En segundo lugar, se realizó una regresión lineal con las tasas de crecimiento micelial de los diferentes aislados donde “x” son las tasas de crecimiento micelial obtenidas con el análisis de imagen e “y” son las tasas de crecimiento micelial obtenidas mediante medición con escalímetro. Para el cálculo de los parámetros cromáticos se obtuvieron las coordenadas cromáticas radiales (r, g y b) en los diferentes radios (Image



Anlaysia Toolbox™). Los datos de las coordenadas cromáticas radiales se analizaron mediante el análisis de componentes principales (PCA). En la reducción de las dimensiones se obtuvieron los parámetros más importantes para caracterizar las características cromáticas de las colonias: PC2 (r-b) que determina el tono y PC3 (r+b) que determina la intensidad de color o concentración de pigmentación. Con estas variables se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) que permitió determinar el efecto de los días de incubación del hongo y del aislado sobre el tono y concentración de pigmentación de las colonias. Los datos de los diferentes parámetros obtenidos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Stastics (v. 21.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la tasas de crecimiento miceliar obtenidos con el método de análisis de imagen han permitido determinar el efecto de las variables “día de incubación del hongo” y “modo de exposición de la cámara fotográfica” sobre la correcta detección de las colonias de las imágenes. El análisis regresión de logística binaria muestra que dichas variables presentan un efecto significativo sobre la correcta detección de las colonias ($p < 0.001$). El modo de exposición presenta un mayor efecto ($OR = 25.03$) sobre la correcta detección de las colonias que el día de la captura de la imagen ($OR = 3.8$); el modo M ($\beta = 3.2$) y el día 4 de la captura ($\beta = 1.33$) presentan una mayor frecuencia errónea en el reconocimiento de las colonias en las imágenes. En la Tabla 1 se muestran las diferentes frecuencias de la detección correcta de las colonias seleccionadas en las imágenes. Al examinar dichas frecuencias puede concluirse que con el modo Av (semiautomático) de la cámara fotográfica y tomando la fotografía a los 3 días de incubación del hongo se obtiene un 97.8% de detección correcta de las colonias frente al 68.8% al tomarse las fotografías el día 4 con el mismo modo. El bajo porcentaje en el reconocimiento adecuado de las colonias en las imágenes con el modo M, puede deberse a que las imágenes con este modo de exposición de la cámara fotográfica presentan mayor saturación de luz lo que dificulta el contraste en la segmentación (en modo manual las condiciones de la cámara se mantuvieron constantes). En cuanto a las diferencias según el día de incubación del hongo, a los 4 días de incubación, el hongo en muchos casos, llega casi a alcanzar los bordes de la placa Petri lo que explica la dificultad de discriminación de la colonia con el borde de la placa.

Tabla 1. Resultados de las frecuencias de reconocimiento correcto de las colonias seleccionadas en las imágenes según el día de incubación y modo de exposición.

Variables	Día de incubación		Modo de exposición		Interacción día de incubación x Modo de exposición			
	Tres	Cuatro	M	Av	Tres x M	Tres x Av	Cuatro x M	Cuatro x Av
% Reconocimiento correcto	59.8	40.2	17.6	82.6	25.0	16.7	97.9	68.8

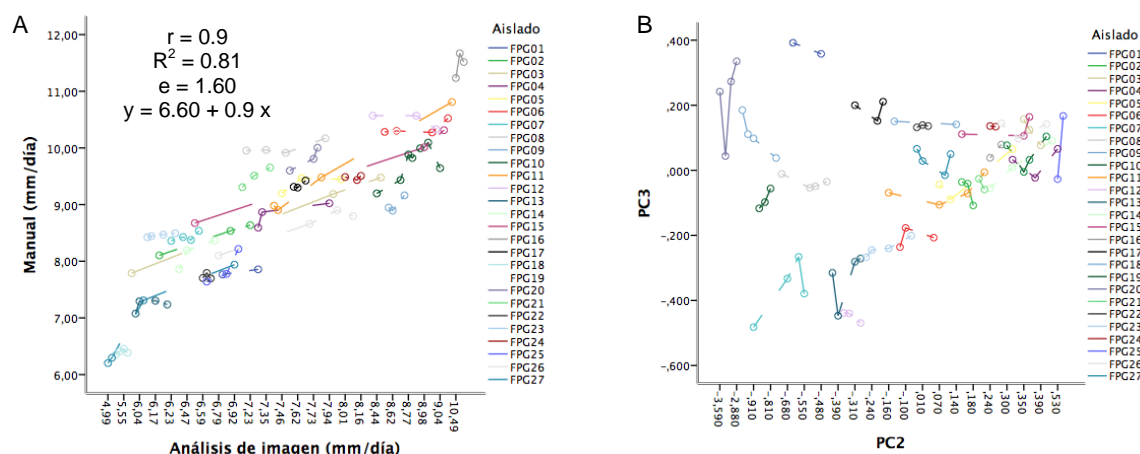
Un vez determinada la influencia del día de incubación del hongo y del modo de la cámara fotográfica, se han tomado los datos de las tasas de crecimiento miceliar del modo Av y la incubación a los 3 días para el análisis de regresión lineal que permite relacionarlos con los datos de crecimiento manual. El modelo de regresión lineal de dichos datos ha permitido determinar que la herramienta de medición de diámetros mediante análisis de imagen es válida comparándola con los diámetros obtenidos en la medición manual (Figura 1A). Los datos medios de las tasas de crecimiento miceliar (mm/día) y sus desviación típicas han sido 8.98 ± 1.21 y 7.53 ± 1.21 con el método manual y automatizado de análisis de imagen, respectivamente.

Los resultados de la tasas de crecimiento miceliar han permitido detectar diferencias entre los aislados de *F. proliferatum* tanto en el método manual como en el análisis



automatizado de imagen. En este sentido, Stepień et al. (2011) citaron diferencias en las tasas de crecimiento entre aislados de *F. proliferatum*, hecho que coincide con nuestros resultados. Estos resultados han permitido establecer que el análisis de imagen es un método adecuado ($R^2=81\%$) para el cálculo de tasas de crecimiento micelial, permitiendo obtenerlas de una forma rápida y fiable.

Figura 1. A. Diagrama de dispersión entre la tasa de crecimiento micelial obtenida de forma manual y la tasa de crecimiento obtenida por análisis de imagen de los diferentes aislados de *F. proliferatum*. B. Diagrama de dispersión entre el PC2 y el PC3 de los diferentes aislados de *F. proliferatum* a los 15 días.



En cuanto a los parámetros cromáticos (r, g y b), el análisis de las coordenadas cromáticas radiales de los diferentes aislados muestran que el perfil cromático rojo permite detectar diferencias entre aislados y entre los días de incubación (7 y 15 días), mientras que los perfiles azul y verde solo permiten detectar diferencias entre aislados. El análisis de varianza de los datos del PC2 indica que tanto el día de incubación del hongo como el aislado presentan un efecto significativo ($p < 0.001$ y $p = 0.003$, respectivamente) sobre el tono de la colonia fúngica; en el caso del análisis de los datos del PC3, los resultados indican que el aislado presenta un efecto significativo ($p < 0.001$) sobre la concentración de pigmentación de la colonia. Los parámetros cromáticos PC2 y PC3 permiten clasificar a los aislados de *F. proliferatum* en diferentes grupos (Figura 1B).

CONCLUSIONES

La técnica del análisis de imagen automatizada desarrollada permite calcular las tasas de crecimiento micelial de hongos de una forma rápida y fiable. Además, esta técnica permite clasificar a los diferentes aislados de *F. proliferatum* a partir de su producción de pigmentos en medio agarizado en base a dos parámetros cromáticos.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a los profesores Daniel Palmero Llamas del Laboratorio de Protección Vegetal-UPM (RedLab 335) y Pilar Barrerio Elorza del grupo LPF_Tagrafia (UPM) por su dedicación y supervisión. Este trabajo ha sido financiado por Coopaman SCL (P1520290111).

BIBLIOGRAFÍA

- Desjardins A. E. 2006. *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology*. Ed. APS Press. 260 pp.
- Jurado M., Marín P., Callejas C., Moretti A., Vázquez C., González-Jaén M. T. 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food microbiology*, 27(1), 50-57.
- Leslie J. F. & Summerell B. A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Ed. Blackwell Publishing. 388 pp.
- Palacios S., Susca A., Haidukowski M., Stea, G., Cendoya E., Ramírez M. 2015. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina. *International journal of food microbiology*, 201, 35-41.
- Stepień Ł., Koczyk G., Waśkiewicz A. 2011. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of applied genetics*, 52 (4), 487-496.